

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-178995

(43)Date of publication of application : 02.08.1991

(51)Int.Cl.

C07K 13/00
 C07K 3/22
 C12N 5/10
 C12N 15/62
 C12P 21/00
 // A61K 39/00
 A61K 39/245
 (C12N 15/62
 C12R 1:19
 C12R 1:92)
 (C12P 21/00
 C12R 1:91)

(21)Application number : 02-235613

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 07.09.1990

(72)Inventor : FUJISAWA YUKIO
 HINUMA KUNIIJI
 MAYUMI AKI
 YAMAMOTO TATSUO

(30)Priority

Priority number : 01233728 Priority date : 08.09.1989 Priority country : JP

(54) PROTEIN AND PREPARATION THEREOF

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A fused protein between a thermolabile enterotoxin B subunit (hereinafter referred to as LTB) and a kind of protein different from the thermolabile enterotoxin (hereinafter referred to as LT).

USE: Useful as an immunogen for treatment vaccines or prevention vaccines or useful for the treatment of various diseases. The fused protein can be efficiently absorbed from the tissue of nasal membrana mucosa.

PREPARATION: A DNA coding LTB (preferably LTB produced from enterotoxigenic Escherichia coli separated from man) is first combined with a DNA coding a kind of protein (e.g. HSV surface protein which is a SHV antigen) different from LT to prepare a fused gene. The fused gene is linked to the downstream portion of a promoter in a manifestation vector to prepare a manifestation vector having a DNA coding the fused protein. A host cell is transformed with the manifestation vector and the transformed product is cultured to prepare the fused protein.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-178995

⑬ Int. Cl.⁵

C 07 K 13/00
3/22
C 12 N 5/10
15/62
C 12 P 21/00

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8619-4H

⑭ 公開 平成3年(1991)8月2日

C
B

8214-4B
8214-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 15 (全 32 頁)

⑮ 発明の名称 蛋白質およびその製造法

⑯ 特 願 平2-235613

⑰ 出 願 平2(1990)9月7日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)9月8日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-233728

㉑ 発 明 者 藤 澤 幸 夫 兵庫県神戸市東灘区御影中町4丁目1番31-104号
㉒ 発 明 者 日 沼 州 司 大阪府吹田市津雲台5丁目18番 D73-207号
㉓ 発 明 者 真 弓 重 紀 大阪府大阪狭山市大字池尻295番地
㉔ 発 明 者 山 本 遼 男 千葉県柏市中新宿1丁目1番30号
㉕ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号
㉖ 代 理 人 弁理士 大多和 明敏 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

蛋白質およびその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) 易熱性エンテロトキシンBサブユニットと易熱性エンテロトキシンとは異種の蛋白質との融合蛋白質。
- (2) 易熱性エンテロトキシンBサブユニットと易熱性エンテロトキシンとは異種の蛋白質とをリンカーを介して融合させた請求項1記載の蛋白質。
- (3) 蛋白質がワクチン用の抗原である請求項1記載の蛋白質。
- (4) ワクチン用の抗原がウイルス抗原、病原性原虫抗原または病原性細菌抗原である請求項3記載の蛋白質。
- (5) 蛋白質が生理活性物質である請求項1記載の融合蛋白質。
- (6) 単純ヘルペスウイルス表面抗原と易熱性エンテロトキシンBサブユニットとの融合蛋白質である請求項1記載の融合蛋白質。

(7) 単純ヘルペスウイルス表面抗原が単純ヘルペスウイルス1型または2型のgDあるいはgBである請求項6記載の融合蛋白質。

(8) 易熱性エンテロトキシンBサブユニットがヒトから分離される毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンBサブユニットである請求項6記載の融合蛋白質。

(9) gDあるいはgBがトランスメンブレン領域の除外されたgDあるいはgBである請求項7記載の融合蛋白質。

(10) 単純ヘルペスウイルス表面抗原をアミノ末端側に、易熱性エンテロトキシンBサブユニットをカルボキシル末端側に配置した請求項6記載の融合蛋白質。

(11) 請求項1記載の融合蛋白質をコードする塩基配列を含有する組換えDNA。

(12) 請求項6記載の融合蛋白質をコードする塩基配列を含有する組換えDNA。

(13) 請求項11または12記載の組換えDNAを保持する形質転換体。

(14) 請求項13記載の形質転換体を培養し、培養物中に請求項1記載の融合蛋白を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該融合蛋白の製造法。

(15) 単純ヘルペスウイルス表面抗原と易熱性エンテロトキシンBサブユニットとの融合蛋白をコードする塩基配列を含有する組換えDNAを保持する形質転換体を培養し、培養物中に該融合蛋白を生成蓄積せしめ、該融合蛋白を採取し、採取された融合蛋白を陽イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過を含む精製工程に付すことを特徴とする該融合蛋白の精製法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、易熱性エンテロトキシンBサブユニット(LTB)と易熱性エンテロトキシン(LT)とは異種の蛋白質との融合蛋白遺伝子を組換えDNA技術を用いて真核生物あるいは原核生物で発現させることによって、治療ワクチンや予防ワクチンの免疫原として有用な融合抗原、および各種

疾病の治療に有用な生理活性融合蛋白を製造する技術に関する。

従来の技術

外来物質または生理活性物質(蛋白)に界面活性剤を添加して鼻粘膜組織からの吸収を高めたり、外来抗原にコレラトキシンを添加して鼻粘膜組織から免疫する試みが検討されている。

発明が解決すべき課題

外来物質または生理活性融合物質の鼻粘膜組織からの吸収を促進させ、また鼻粘膜組織から免疫するために適した蛋白の作製が望まれている。

課題を解決するための手段

本発明者らは、局所への外来蛋白のターゲティングによって、鼻粘膜組織からの該蛋白の吸収や免疫に適した抗原を作製することを目標に研究を進めた結果、LTBとLTとは異種の蛋白質とを遺伝子工学的に結合させた融合蛋白が、この目的を達成し得ることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、(1) LTBとLTとは異種の蛋白質とを遺伝子工学的に結合させた融合

- 3 -

蛋白、(2) 上記(1)記載の融合蛋白をコードする塩基配列を含有する組換えDNA、(3) 上記(2)記載の組換えDNAを保持する形質転換体、(4) 上記(3)記載の形質転換体を培養し、培養物中に上記(1)記載の融合蛋白を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該融合蛋白の製造法に関するものである。

異種の蛋白質としては、例えば、ワクチン用の抗原(蛋白またはポリペプチド)や生理活性蛋白(蛋白またはポリペプチド)があげられる。

ワクチン用の抗原としては、例えば、単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、サイトメガロウイルス(CMV)をはじめとするヘルペスウイルスの抗原、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)をはじめとするレトロウイルスの抗原、B型肝炎ウイルス(HBV)をはじめとするヘパドナウイルスの抗原、非A非B型肝炎ウイルス(HCV, HEV)、日本脳炎ウイルスをはじめとするトガウイルスの抗原、A型肝炎

- 4 -

炎ウイルス(HAV)をはじめとするピコルナウイルスの抗原、インフルエンザウイルスをはじめとするオルソミキソウイルスの抗原、パルボウイルスの抗原、パポウイルスの抗原、アデノウイルスの抗原、ポックスウイルスの抗原、レオウイルスの抗原、パラミキソウイルスの抗原、ラブドウイルスの抗原、アレナウイルスの抗原、コロナウイルスの抗原などの動物を宿主とするウイルスの抗原、マラリア抗原などの病原性原虫の抗原、百日咳菌抗原などの病原性細菌の抗原などが挙げられる。

生理活性蛋白質としては、外来、あるいはヒト由来の生理活性ペプチドや蛋白質(例、ホルモン(インスリン、ヒト成長ホルモン、ゴナドトロピン、インヒビン、プロラクチンなど)、酵素(セラチオペプチターゼなど)、サイトカイン(インターフェロン(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、インターロイキン(IL)-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マク

- 5 -

-1066-

- 6 -

ロファージコロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチンなど)、成長因子(塩基性繊維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子など)が挙げられる。

蛋白質、例えばワクチン用の抗原とLTBとはリンカーを介して融合していてもよい。リンカーはG, A, V, L, I, S, T, C, M, E, D, K, R, H, F, Y, W, P, N, Qから選ばれた1個のアミノ酸残基または2~30個程度のアミノ酸残基からなるペプチド(好ましくは、1個のアミノ酸残基または2~10個程度のアミノ酸残基からなるペプチド)で構成される。

具体的な例として、以下にHSV抗原であるHSV表面蛋白とLTBとの融合蛋白を説明する。

HSV表面蛋白としては、トランスメンブレンドメインの除去された糖蛋白gDおよびgBが有利に用いられる。

本発明では特に、(1)トランスメンブレンドメインの除去されたgDとLTBとの融合蛋白(I)、またはトランスメンブレンドメインの除

去されたgBとLTBとの融合蛋白(II); (2)融合蛋白(I)あるいは(II)をコードする塩基配列を含有する組換えDNA(それぞれIIIおよびIV); (3)組換えDNA(III)または(IV)を保持する形質転換体; および(4)組換えDNA(III)または(IV)を保持する形質転換体を培養し、培養物中に融合蛋白(I)または(II)を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該融合蛋白(I)または(II)の製造法を提供するものである。

HSVの表面蛋白遺伝子としては、例えばHSV-1型深山株等、HSV-1型や2型の各種の株のgD遺伝子やgB遺伝子を用いることができる。gDとしては第1図のようなアミノ酸配列のもの(HSV-1型深山株の表面蛋白gD、特開平2-182196号)が例として挙げられるが、この中の必須の部分はNo. 26のLysからNo. 302のAlaである。このgDをコードする塩基配列を含有するDNAとしては第2図に示すものが一例として挙げられる。そのNo. 186

- 7 -

からNo. 1016までがその必須部分に相当する。またgBとしては第3図(HSV-1型深山株の表面蛋白gB、平成1年6月22日出願の特願平1-158238号および平成1年11月30日出願の特願平1-308941号)のアミノ酸配列のポリペプチドがその一例として挙げられるが、この中必須の部分はNo. 1のAlaからNo. 293のAspまでである。このgBをコードする塩基配列を含有するDNAとしては第4図に示すものが一例として挙げられる。そのNo. 341からNo. 1219までがその必須部分に相当する。

更にgB遺伝子の例として、第5図(HSV-1型KOS株の表面蛋白gB、D.J.Bzikら、ウィロロジー(Virology, 133, 301(1984))、第6図(HSV-1型F株の表面蛋白gB、P.E.Pelletら、ジャーナル・オブ・ウィロロジー(J.Virol., 53, 243(1985))のような塩基配列、それから推定されるアミノ酸配列のものが例として挙げられる。これらの遺伝子、より好ましくはトランスメンブレンドメインのコード領域を除いたランゲイ

- 8 -

テッドgDやgB遺伝子に、LTB遺伝子を結合させることによって融合蛋白遺伝子を構築することができる。

LTB遺伝子としては、LTB活性物質をコードするものであればいずれのものも用いることができる。LTB活性物質としては、LTB活性、すなわちアジュバント作用を有する物質であればいずれでもよい。例えばヒトやブタから分離される毒索原性大腸菌で産生される天然のLTBや遺伝子組換え技術で生産させる組換え型LTBやこれらの関連物質が挙げられるが、なかでもヒトから分離された毒索原性大腸菌の産生するLT(LThと略称)のBサブユニット(LThBと略称)が好ましい。上記LTBやこれらの関連物質は、蛋白質である場合、糖鎖を有していてもよく、また有さなくてもよい。

本発明に用いるLTBをコードするDNAとしては、毒索原性大腸菌の産生するLTBをコードするDNAであればいずれでもよく、当該DNAは天然由来のものあるいは化学合成したもののい

- 9 -

-1067-

- 10 -

ずれでもよく、またLTB遺伝子またはその一部であってもよい。

本発明に用いるLTBをコードするDNAは、具体的には、例えばLTh遺伝子がクローン化されたプラスミドpJYL2299(Yamamoto, T. および Yokota, T., ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol., 143, 652(1980))から適当な制限酵素を用いることによって調製することができ、該DNAがサブクローン化されたプラスミドを大腸菌内で増幅することにより、大量にLThBをコードするDNAを調製することができる。

本発明における融合蛋白(I)または(II)をコードする塩基配列を含有する組換えDNA(発現用プラスミド)は例えば(イ)HSV-1型深山株のgDまたはgB遺伝子がクローン化されたプラスミドから、目的とするトランケイテッド遺伝子を切り出し、(ロ)必要により適当なリンカーを付加させた後、該DNAの3'末端側にLTB遺伝子を結合した融合遺伝子を構築し、(ハ)該融合蛋白遺伝子を発現ベクター中のプロモーターの下

流に連結することにより、融合蛋白をコードするDNAを作製することができる。

本発明に用いるベクター(例、プラスミド)としては、宿主である真核細胞に対応して複製可能なものであれば何でもよい。宿主が酵母の場合には、例えばpSH19(Harasima, S.ら、モレキュラー・セルラー・オブ・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 4, 771(1984))、pSH19-1(ヨーロッパ特許出願公開EP-A-0235430)などが挙げられ、これらにプロモーターを挿入することによって外来遺伝子発現用ベクターが得られる。宿主が動物細胞の場合には、例えばpBR322にSV40由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーターなどを挿入することによって外来遺伝子発現用ベクターが得られる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。宿主が酵母である場合は、GLD(GAPH)プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、A

- 11 -

DHプロモーター、PHO81プロモーターなどが好ましく用いられる。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーターなどが挙げられる。

プロモーターは対応する遺伝子より酵素的に調製することができる。また、化学合成することもできる。

このようにして構築された組換えDNAを含有するベクターを用いて、真核細胞を形質転換する。

宿主としては、酵母、動物細胞などが挙げられる。酵母としては、たとえばサッカロマイセスセレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5Dやシゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) ATCC38399 (h⁻leu1-32), TH168 (h⁺ade6-H210 ura1 leu1)(M. Kishida and C. Shimada, カレント・ジェネティクス(Current Genetics), 10, 443 (1986))などが挙げられる。

動物細胞としては、たとえば付着細胞であるサ

- 12 -

ルCOS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズハムスター(CHO)細胞、マウスL細胞、ヒトFL細胞、および浮遊細胞であるマウスミエローマ細胞(SP2/Oなど)、マウスYAC-1細胞、マウスMethA細胞、マウスP388細胞、マウスEL-4細胞などが挙げられる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 1929(1978)に記載の方法に従って行われる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー(Virology), 52, 456(1973)に記載の方法に従って行われる。

このようにして得られた形質転換体(組換え体)をそれ自体公知の方法で培養する。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー(Burkholder)最小培地(Bostain, K.L. ら「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77, 4505

- 13 -

- 1068 -

- 14 -

(1980)が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地(サイエンス(Science), 122, 501(1952)), DMEM培地(ヴィロロジー(Virology), 8, 396(1959)), RPMI 1640培地(ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519(1967)), 199培地(プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1(1950))などが挙げられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

本発明によれば、HSV表面抗原性とLTBの

両活性をもつ融合蛋白は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

HSV表面抗原性とLTBの両活性を有する融合蛋白の分離・精製には、イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過(ゲルパーミエーションクロマトグラフィー)の組み合わせが好ましい。イオン交換用充填剤としては、スルホ基を交換基とする陽イオン交換樹脂(例、SP-Toyopearl 650H)が好ましい。カラムの平衡化に用いられる溶媒としては20mMリン酸緩衝液(pH5.8)があげられ、

- 15 -

溶出溶媒としては、0~1M NaClを含む20mMリン酸緩衝液(pH5.8)があげられる。ゲルろ過用充填剤としては、分子量 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 程度の蛋白質を分離可能な多孔質粒子(例、Sephacryl S-300HR)が好ましい。ゲルろ過用溶媒としては、0.5~1.5% NaClを含む5~20mMリン酸緩衝液(pH5.8~7.2)が好ましい。

HSV表面抗原蛋白以外の異種蛋白とLTBとの融合蛋白は、HSV表面抗原蛋白遺伝子の代わりにその異種蛋白をコードする遺伝子(DNA)を用い、上記の方法に従って製造することが出来る。

作用及び効果

本発明で得られる抗原蛋白-LTB融合蛋白あるいは生理活性蛋白-LTB融合蛋白は、非融合型蛋白と比べ、鼻粘膜組織へのターゲティングの効果がはるかに良い。LTBには粘膜上皮細胞膜上の糖脂質と特異的に結合する作用が有るだけでなく、共存する蛋白の粘膜組織からの吸収を増強する作用を有するが、LTBを目的の蛋白と融

- 16 -

合した場合にはさらにその作用は高い。その結果、抗原蛋白の場合には鼻粘膜局所を通して、生体の免疫反応を効率良く誘導することが出来る。また、生理活性蛋白の場合には鼻粘膜組織より効率良く吸収させることが出来る。

本発明で得られた抗原蛋白-LTB融合蛋白は、ウイルス、病原性原虫、病原性細菌の感染予防や治療のためのワクチンとして、筋肉内、皮下、皮内に投与できる以外に、経鼻的にも投与できる。また、本発明で得られる生理活性蛋白-LTB融合蛋白は、経鼻投与によって粘膜組織から吸収させることが出来る。HSV抗原-LTB融合蛋白の場合には、経鼻的投与も有効である。

なお、本願明細書や図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次に挙げる。またアミノ酸に関して光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

- 17 -

-1069-

- 18 -

DNA : デオキシリボ核酸
 A : アデニン
 T : チミン
 G : グアニン
 C : シトシン
 SDS : ドデシル硫酸ナトリウム
 Gly : グリシン (G)
 Ala : アラニン (A)
 Val : バリン (V)
 Leu : ロイシン (L)
 Ile : イソロイシン (I)
 Ser : セリン (S)
 Thr : スレオニン (T)
 Cys : システイン (C)
 1/2Cys : ハーフシスチン
 Met : メチオニン (M)
 Glu : グルタミン酸 (E)
 Asp : アスパラギン酸 (D)
 Lys : リジン (K)
 Arg : アルギニン (R)

His : ヒスチジン (H)
 Phe : フェニールアラニン (F)
 Tyr : チロシン (Y)
 Trp : トリプトファン (W)
 Pro : プロリン (P)
 Asn : アスパラギン (N)
 Gln : グルタミン (Q)
 Ap^r : アンピシリン耐性遺伝子
 Tet^r : テトラサイクリン耐性遺伝子

なお、本発明のペプチドにおいては、そのアミノ酸配列の一部が修飾（付加、除去、その他のアミノ酸への置換など）されていてもよい。

実施例

以下の参考例および実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

後述の実施例8で得られたプラスミドpHDTdhfr2を保持する形質転換体CHO-HDT-2-35は、平成1年9月8日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受

- 18 -

託番号FERM BP-2590として寄託され、また該微生物は平成1年8月24日から財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 50209として寄託されている。

また、実施例8で得られたプラスミドpHDTneo1を保持する形質転換体Sp-neo-HDT-13-71は、平成2年8月17日からFRIに受託番号FERM BP-3071として寄託され、また該微生物は平成2年8月8日からIFOに受託番号IFO 50254として寄託されている。

後述の参考例に記載のプラスミドpHSDBJ-1を保持する形質転換体Escherichia coli DH1/pHSDBJ-1は、昭和63年3月9日からFRIに受託番号FERM BP-1784として寄託され、また該微生物は昭和63年2月23日からIFOに受託番号IFO 14730として寄託されている。

参考例1 プラスミドpHSG396SgDの作

製(第7図)

gDのN末端20アミノ酸残基をコードするDNA、すなわち第7図に示す73bp DNA断片を化学的に合成し、これを制限酵素BamHIとHindIIIで消化したベクターpUC8に挿入した。

得られたpUC8 BamHI-HindIII 73をBamHIとNcoIで消化して得られた73bp断片と、HSVのgDコード領域を含む約1.4kbのHindIII-NruI断片〔プラスミドpHSDBJ-1(IFO 14730, FERM BP-1784由来)のクローン化されたプラスミドpUC18gDから得られた約1.28kbのNcoI-SacI DNA断片をプラスミドベクターpHSG396のBamHI-SacI消化物と反応させ、サブクローニングプラスミドpHSG396SgDを作製した。

参考例2 HSV-1型のtruncated gD遺伝子の構築(第8図)

HSV-1型深山株gD遺伝子を有するプラス

- 22 -

ミドベクター p H S G 3 9 6 S g D (参考例 1) を制限酵素 X h o I と X b a I で消化して約 1.35 kb の DNA 断片を得、さらに制限酵素 H i n f I で消化して約 0.91 kb の X h o I - H i n f I 断片を得た。第 8 図に示すストップコドン有する 12 bp DNA 断片を化学的に合成し、これと上記 X h o I - H i n f I 断片をプラスミドベクター p H S G 3 9 7 の X h o I - S a o I 消化物と反応させ、サブクローニングプラスミド p H S G 3 9 7 S g D Δ H i n f を作製した。

実施例 1. H S V - 1 型の truncated g D (t-g D) の動物細胞発現用プラスミドの構築 (第 9 図)

参考例 2 に記載のプラスミド p H S G 3 9 7 S g D Δ H i n f を X h o I - S a o I で消化した後、T4 DNA ポリメラーゼを作用させ、約 0.9 kb の t-g D 遺伝子を含む両端が平滑な断片を得た。

次にプラスミド p T B 3 9 9 (特開昭 61-6328

2号公報; Sasada, R ら、セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション (Cell Structure and function), 12, 205(1987)) を制限酵素 E o o R I と B g l II で消化後、T4 DNA ポリメラーゼを作用させ、約 3.9 kb の両端が平滑な断片を得た。この断片と上記の t-g D を含む断片とを T4 DNA リガーゼで反応させることにより、発現プラスミド p H S D 2 0 9 を得た。

次に、この遺伝子を CHO 細胞で安定的に発現させて遺伝子増幅も可能にするために、p H S D 2 0 9 を制限酵素 C l a I で消化して得られる約 2.4 kb をプラスミド p T B 3 4 8 (特開昭 61-63282号公報参照) の C l a I 部位に挿入することにより、プラスミド p H S D d h f r 1 および p H S D d h f r 2 を得た。

実施例 2 H S V - 1 型の truncated g D の動物細胞における発現

実施例 1 において構築したプラスミド p H S D d h f r 1 をリン酸カルシウム法 (Gorman C.M. ら、サイエンス (Science), 221, 551-553(1983))

- 23 -

により CHO 細胞 D H F R⁻ 株 (Urlaub G and Chasin, L.A. プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77, 4216-4220(1980)) を形質転換し、D H F R⁺ となった形質転換体を得た。

得られた形質転換体 CHO-H S D-1-7 を、10% 牛胎児血清 (Whittaker M.A. Bioproducts 社製) を含むダルベッコ-M E M 培地 (GIBCO 社製) でコンフルエントになるまで培養した後、メチオニン不含の培地に交換し、25 μCi / ml の³⁵S-メチオニンを加えて一晚培養した。

この培養上清を回収後、上清 1 ml につき、5 μl のウサギ抗 H S V - 1 血清 (DAKOPATT 社製) を加え、4℃で2時間インキュベートした。次にプロテイン A-セファロース (Pharmacia 社製) を加えて、さらに4℃で2時間インキュベートした後、遠心して沈殿を回収した。この沈殿を 0.05% NP-40 を含むバッファーで洗浄後、Laemmli buffer を加えて 100℃、5 分間加熱した。冷却後、遠心して上清を回収し、SDS-ポリアク

- 24 -

リルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィーを行った結果、抗 H S V - 1 抗体と反応する約 43~30 kDalton の分子種の生成していることが分かった。

実施例 3 動物細胞において発現した H S V - 1 型の truncated g D (t-g D) の精製

実施例 2 に記載の方法で培養した CHO-H S D-1-7 細胞株の培養液 1.8 l を 20 mM Tris を含む緩衝液 (pH 8.0) 36.0 l に対して 4℃、16 時間透析した。この透析液 2.0 l に硫酸アンモニウム 336 g を徐々に加え、4℃、2 時間攪拌しつつ溶解した。

上記の溶解液を 168 g / l 硫酸アンモニウム-20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したブチルトヨパール 650 M (東洋ソーダ社製) カラム (2.6 × 18.8 cm, 100 ml) に負荷し、同緩衝液 1.0 l で洗浄した後、168 g / l 硫酸アンモニウム-20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) から 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) までのリニアグラジエント (容量 500 ml

- 25 -

- 1071 -

- 26 -

4) により溶出した。約140m³の抽出液をセントリプレッパ10(アミコン社、米国)を用いて14m³にまで濃縮した。

上記のブチルトヨパールカラムによって精製されたt-gD画分を蒸留水に対して透析した後、除菌ろ過して、536μg/m³濃度のt-gD精製標品14m³を得た。

実施例4 動物細胞から精製されたHSV-1型のtruncated gD(t-gD)の性質

実施例3で得た精製t-gD標品について以下の性質を調べた。

ラエムリ[ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)]の方法に準じてSDS-ポリアクリルアミドスラブ電気泳動を行った後に、銀染色を行った。その結果、該t-gD蛋白質は43,000ダルトンから30,000ダルトンにかけての分子種から構成されていた。

実施例5 HSV-1型のtruncated gD(t-gD)とLThBとから成る融合蛋白の遺伝子発現プラスミドの構築(第10

図)

参考例2に記載のpHSG397SgDΔHinfiをHinfIで消化し、約0.95kbのDNA断片を分離した。この断片をKlenowフラグメントで平滑末端とし、NheIリンカーを結合させた後、NheIで消化した。この断片をさらにEcoRIで消化し、t-gDをコードする約0.9kbのEcoRI-NheI断片を分離した。

次にE. coli heat-labile toxinの遺伝子を含むプラスミドpJYL2299(T. Yamamotoら、ジャーナル オブ バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 148, 983(1981))を制限酵素HindIIIで消化してBサブユニットを含む0.77kbの断片を回収し、pBR322のHindIII消化物と反応させることにより、サブクローニングプラスミドpBRLThBを得た。さらに、このプラスミドを制限酵素SaeIで消化しT4DNAポリメラーゼを作用させた後、NheIリンカー(pCGCTAGCG)(ファルマシア社製)をT4DNAリガーゼを用いて付加し、プラスミドpBRLThB-N

- 27 -

を得た。このプラスミドを制限酵素DraIとHindIIIで消化して得られる約0.59kbのDNA断片にBglIIリンカー(pGAAGATCTTC)(NEB社製)をT4DNAリガーゼを用いて付加後、NheIとBglIIで消化し、LThBコード領域を含む0.32kb NheI-BglII断片を得た。

上記の0.9kbおよび0.32kb DNAの断片と、pTB389(特開昭61-63282号公報; Sasada, R, セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション(Cell Structure and Function), 12, 205(1987))をEcoRI-BglII消化して得られた約3.9kbの断片とを反応させることにより、t-gDとLThBとから成る融合蛋白(t-gD-LThB)の遺伝子発現プラスミドpHDT201を得た。

さらに、この融合蛋白遺伝子をCHO細胞で発現させて遺伝子増幅を可能にするために、pHDT201をSaeIとHindIIIで消化して得たt-gD-LThB融合蛋白の遺伝子を含む約2.8kb DNA断片を、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)

- 28 -

遺伝子発現プラスミドpTB348(特開昭61-63282号公報参照)をSaeIとHindIIIで消化して得られた約4.5kbの断片とを反応させることにより、プラスミドpHDTdhfr2を得た(第10図)。

また、得られた融合蛋白遺伝子の塩基配列を第11図に、推定されるアミノ酸配列を第12図に示す。

実施例6 HSV-1型のtruncated gDとLThBとから成る融合蛋白遺伝子の動物細胞における発現

実施例5において構築したプラスミドpHDTdhfr2を実施例2と同様にリン酸カルシウム法を用いてCHO細胞DHFR⁻株に導入し、DHFR⁺となった形質転換体を得た。

得られた形質転換体CHO-HDT-2-35(IFO 50209, FERM BP-2590)を、実施例2と同じ方法で培養し、³⁵S-メチオニンでアイソトープラベルした後、ウサギ抗HSV-1抗体とヤギ抗コレラトキシン抗体(LIST BIOLOGICAL LABORATORIES社製)を用いて、遺

伝子産物を免疫沈降させた。

実施例 7 HSV-1 型の truncated gD (t-gD) と LThB とから成る融合蛋白遺伝子のミエローマ細胞用発現プラスミドの構築

実施例 5 において構築したプラスミド pHDT 201 を制限酵素 SalI と EcoRI で消化することにより t-gD と LThB の融合蛋白遺伝子を含む約 3.9kb の断片を得た。また、ネオマイシン耐性遺伝子を持った t-gD 発現用プラスミド pHS D・neo1 (平成 2 年特許願第 177258) を SalI と RcoRI で消化し、ネオマイシン耐性遺伝子を含む約 4.4kb の断片を得た。これら 2 つの断片を反応させることにより、ネオマイシン耐性遺伝子を持つ、t-gD-LThB 融合蛋白遺伝子の発現プラスミド pHDT・neo1 を得た (第 13 図)。

実施例 8 HSV-1 型 truncated gD (t-gD) と LThB とから成る融合蛋白遺伝子のミエローマ細胞での発現

電気泳動を行い、さらにウサギ抗 HSV-1 血清 (DAKOPATT 社製) およびヤギ抗コレラトキシン血清を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、いずれの抗体によっても認識されるバンドが特異的に検出された。

実施例 9 truncated gD と LThB とから成る融合蛋白 (t-gD-LThB) の精製

実施例 8 で得られた形質転換体 Sp-neo-HDT-13-71 を無血清培地 ASF104 (味の素社製) に浮遊し、37℃、5% CO₂ で 4 から 7 日間培養した。培養液を日立社製 CR26H 型遠心分離機にて 30 型ローターを用いて、4,000rpm、20 分間遠心分離することにより培養上清 5.5 ml を得た。培養上清は 20mM リン酸緩衝液 (pH 5.8) に対して透析した後、No. 2 ろ紙 (アドバンテック東洋製) でろ過し、得られたろ液を同緩衝液で平衡化した SP-Toyopearl 650M (東ソー社製) カラム (ベッド容量 540ml、φ4.1×41cm) にかけて、カラムを同緩衝液で洗浄した後、NaCl 濃度が 0 から 1M のグラジ

実施例 7 において構築したプラスミド pHDT・neo1 をジーンパルサー (BIO-RAD 社製) を用いてエレクトロポレーションを行い、マウスミエローマ細胞 Sp2/O-Ag14 (大日本製薬社) を形質転換後、200μg/ml の G418 (GIBCO 社製) および 10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO 社製) で培養することにより G418 耐性となった形質転換体を得た。これら形質転換体の培養上清を、ウサギ抗 HSV-1 血清 (DAKOPATT 社製) をコートしたマイクロプレート (スunk 社製) とビオチン化ウサギ抗 HSV-1 および 2 抗体 (ケミコン社製) を用いたサンドイッチ法によるエンザイムイムノアッセイでスクリーニングし、t-gD を発現しているクローンを得た。

得られたクローンのうち発現量の比較的多い Sp-neo-HDT-13-71 を無血清培地 ASF104 (味の素社製) で培養し、その上清 1ml をモルカット (ミリポア社製) で濃縮し、Laemmli Buffer を加えて 50μl とし、100℃、5 分間加熱した。冷却後、SDS ポリアクリルアミドゲル

エント (計 4 ml) によって t-gD-LThB を溶出した。約 0.2 から 0.35M の NaCl 濃度で溶出された t-gD-LThB 溶出面分 (427ml) を限外ろ過 (アミコン、YM10) で 8.3ml に濃縮し、これを PBS で平衡化した Sephacryl S-300HR (Pharmacia 社製) カラム (ベッド容量 198ml、φ1.6×98.5cm) にかけて、t-gD-LThB 面分を限外ろ過 (アミコン、YM10) で濃縮して精製標品 (1.725mg/0.845ml) とした。

実施例 11 HSV-1 型の truncated gD と LThB とから成る融合蛋白 (t-gD-LThB) の免疫原性

BALB/c マウス (メス、8 週齢、チャールズ・リバー社産) の腹腔内に、実施例 10 で取得した t-gD-LThB を投与した (16μl/マウス)。5 週後に採血し、サンプル血清を調製した。また、腹腔内を PBS で数回洗浄することにより洗浄液を得た。これらの検体中の抗 HSV 抗体は以下の方法で測定した。

ヒト抗HSV抗体測定キット(ヘルペススタット, Whittaker Bioproducts 社製, ロット番号002706)の不活性化HSVコートマイクロプレート(20% FCS含有PBSでブロッキング(室温, 2時間)した後, 0.05% Tween 20含有PBS (PBS-Tween) で3回洗浄した。このプレートに20% FCS / 40mM Tris-HCl (pH7.5) / 5% NaCl / 0.05% Tween 20で希釈したサンプル血清をウェルあたり100 μ l加え、室温で1時間インキュベーションした。プレートをPBS-Tweenで6回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体あるいは抗マウスIgA (Zymed Laboratories 社製)を100から1000倍に希釈した液をウェル当たり100 μ l加え、室温で30分間インキュベーションした。プレートをPBS-Tweenで6回洗浄した後、基質液(2mg/ml o-フェニレンジアミン / 0.02% H₂O₂ / 0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.5))をウェル当たり100 μ l加え、10分間反応させた。2Nの硫酸をウェル当たり200 μ l加えて発色を停止させた後、492nmの吸光度を測定した。その結果、t-gD-LThBを鼻腔内に投与することにより、効率よくHSVに対するIgGおよびIgA抗体を血中ならびに鼻腔内局所に誘導できることが分かった。

4. 図面の簡単な説明

第1図はHSV-1型深山株の表面蛋白gD遺伝子のアミノ酸配列の一例を示す図であり、第2図は第1図のアミノ酸配列に対応する塩基配列の一例である。

第3図はHSV-1型深山株の表面蛋白gB遺伝子のアミノ酸配列の一例を示す図であり、第4図は第3図のアミノ酸配列に対応する塩基配列の一例である。

第5図はHSV-1型KOS株の表面蛋白gBの塩基配列の一例、それから推定されるアミノ酸配列を示す図であり、第6図はHSV-1型F株の表面蛋白の塩基配列の一例、それから推定されるアミノ酸配列を示す図である。

第7図はプラスミドpHSG396SgDの構

- 35 -

- 36 -

築図であり、第8図はHSV-1型のtruncated gD遺伝子の構築図である。

第9図はHSV-1型のtruncated gDの動物細胞発現用プラスミドの構築図である。

第10図は本発明の融合蛋白遺伝子発現プラスミドの構築図であり、第11図は本発明で得られた融合蛋白遺伝子の塩基配列を示す図であり、第12図は第11図の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す図である。

第13図は本発明の融合蛋白遺伝子発現プラスミドの構築図である。

代理人 大多和 明敏
代理人 大多和 曉子

第 1 図

1 Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
 17 Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala
 33 Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro
 49 Val Leu Asp Pro Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg Arg Val Tyr His
 65 Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile
 81 Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu
 97 Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp
 113 Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly
 129 Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser
 145 Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp
 161 Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe
 177 Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu
 193 Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His
 209 Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro
 225 Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp
 241 Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val
 257 Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro
 273 Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala
 289 Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu
 305 Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp His
 321 Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr
 337 Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu
 353 Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met His Arg Arg Thr
 369 Arg Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp
 385 Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr

第 2 圖

1 TTT AAA AAG CAG GGG TTA GGG AGT TGT TCG GTC ATA AGC TTC AGC
 46 GCG AAC GAC CAA CTA CCC CGA TCA TCA GTT ATC CTT AAG GTC TCT
 91 TTT GTG TGG TGC GTT CCG GTA TGG GGG GGG CTG CCG CCA GGT TGG
 136 GGG CCG TGA TTT TGT TTG TCG TCA TAG TGG GCC TCC ATG GGG TCC
 181 GCG GCA AAT ATG CCT TGG CGG ATG CCT CTC TCA AGA TGG CCG ACC
 226 CCA ATC GCT TTC GCG GCA AAG ACC TTC CGG TCC TGG ACC CGC TGA
 271 CCG ACC CTC CGG GGG TCC GGC GCG TGT ACC ACA TCC AGG CGG GCC
 316 TAC CGG ACC CGT TCC AGC CCC CCA GCC TCC CGA TCA CGG TTT ACT
 361 ACG CCG TGT TGG AGC GCG CCT GCC GCA GCG TGC TCC TAA ACG CAC
 406 CGT CGG AGG CCC CCC AGA TTG TCC GCG GGG CCT CCG AAG ACG TCC
 451 GGA AAC AAC CCT ACA ACC TGA CCA TCG CTT GGT TTC GGA TGG GAG
 496 GCA ACT GTG CTA TCC CCA TCA CGG TCA TGG AGT ACA CCG AAT GCT
 541 CCT ACA ACA AGT CTC TGG GGG CCT GTC CCA TCC GAA CGC AGC CCC
 586 GCT GGA ACT ACT ATG ACA GCT TCA GCG CCG TCA GCG AGG ATA ACC
 631 TGG GGT TCC TGA TGC ACG CCC CCG CGT TTG AGA CCG CCG GCA CGT
 678 ACC TGC GGC TCG TGA AGA TAA ACG ACT GGA CCG AGA TTA CAC AGT
 721 TTA TCC TGG AGC ACC GAG CCA AGG GCT CCT GTA AGT ACG CCC TCC
 766 CGC TGC GCA TCC CCC CGT CAG CCT GCC TCT CCC CCC AGG CCT ACC
 811 AGC AGG GGG TGA CCG TGG ACA GCA TCG GGA TGC TGC CCC GCT TCA
 856 TCC CCG AGA ACC AGC GCA CCG TCG CCG TAT ACA GCT TGA AGA TCG
 901 CCG GGT GGC ACG GGC CCA AGG CCC CAT ACA CGA GCA CCC TGC TGC
 946 CCC CTG AGC TGT CCG AGA CCC CCA ACG CCA CGC AGC CAG AAC TCG
 991 CCC CCG AAG ACC CCG AGG ATT CCG CCC TCT TGG AGG ACC CCG TGG
 1036 GGA CCG TGG CGC CGC AAA TCC CAC CAA ACT GGC ACA TCC CGT CGA
 1081 TCC AGG ACG CCG CGA CGC CTT ACC ATC CCC CCG CCA CCC CGA ACA
 1126 ACA TGG GCC TGA TCG CCG GCG CCG TGG GCG GCA GTC TCC TGG CAG
 1171 CCC TGG TCA TTT GCG GAA TTG TGT ACT GGA TGC ACC GCC GCA CTC
 1216 GGA AAG CCC CAA AGC GCA TAC GCC TCC CCC ACA TCC GGG AAG ACG
 1261 ACC AGC CGT CCT CGC ACC AGC CCT TGT TTT ACT AGA TAC CCC CCC
 1306 TTA ATG GGT GCG GGG GGG TCA GGT CTG CCG GGT TGG GAT GGG ACC
 1351 TTA ACT CCA TAC AAA GCG AGT CTG GAA GGG GGG AAA GGC GGA CAG
 1396 TCG ATA AGT CCG TAG CCG GGG ACG CGC ACC TGT TCC GCC TGT CGC
 1441 ACC CAC AGC TTT TTC GCG A

第3図—1

Ala Pro
 Ser Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Asn
 Gly Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Pro Gly Pro Ala Pro Thr
 Gly Asp Thr Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Pro Pro
 Pro Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr
 Leu Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Lys Asn Thr Asp Ala Asn
 Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu
 Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu
 Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys
 Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly
 His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val
 Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg
 Ser Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His
 Arg Asp Asp His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala
 Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro
 Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile
 Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asn Glu Phe Val
 Leu Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg
 Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys
 Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala
 Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val
 Ala Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys
 Trp Gln Glu Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe
 Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr
 Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp
 Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Arg Tyr Asn Ala Thr
 His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn Gly Gly Phe
 Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr

第3図-2

Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Pro Thr
 Pro Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys
 Thr Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His
 Ile Gln Arg His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp
 Cys Glu Leu Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys
 Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Val Thr Val Gly Arg Arg Val Ser
 Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val
 Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile Ser Ser Arg
 Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp
 Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg
 Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser
 His Gln Leu Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp
 Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val
 Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu
 Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp
 Thr Val Ile His Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Gly
 Ala Phe Phe Glu Gly Met Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val
 Val Met Gly Ile Val Gly Gly Val Val Ser Ala Val Ser Gly Val Ser
 Ser Phe Met Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val
 Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Met Arg
 Leu Gln Ser Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu
 Leu Lys Asn Pro Thr Asn Pro Asp Ala Ser Gly Glu Gly Glu Glu Gly
 Gly Asp Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg
 Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu His Thr Glu His Lys Ala Lys
 Lys Lys Gly Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ala Lys Val Thr Asp Met Val
 Met Arg Lys Arg Arg Asn Thr Asn Tyr Thr Gln Val Pro Asn Lys Asp
 Ser Asp Ala Asp Glu Asp Asp Leu

第4図—1

1 GAGTTGCGCCGCCCG 15
 GACTGCAGCCGCCCGACCTCCGAAGGTCGTTACCGTTACCCGCCCGGCGTAT 67
 ATCTCACGTACGACTCCGACTGTCCGCTGGTGGCCATCGTCGAGAGCGCCCC 119
 CGACGGCTGTATCGGCCCCCGGTCGGTCGTGGTCTACGACCGAGACGTTTTT 171
 TCGATCCTCTACTCGGTCCTCCAGCACCTCGCCCCCAGGCTACCTGACGGGG 223
 GGCACGACGGGGCCCCCGTAGTCCCGCC ATG CGC CAG GGC GCC CCC GCG 271
 CGG GGG TGC CGG TGG TTC GTC GTA TGG GCG CTC TTG GGG TTG ACG 316
 CTG GGG GTC CTG GTG GCG TCG GCG GCT CCG AGT TCC CCC GGC ACG 361
 CCT GGG GTC GCG GCC GCG ACC CAG GCG GCG AAC GGG GGA CCT GCC 406
 ACT CCG GCG CCG CCC GCC CCT GGC CCC GCC CCA ACG GGG GAC ACG 451
 AAA CCG AAG AAG AAC AAA AAA CCG AAA AAC CCA CCG CCG CCG CGC 496
 CCC GCC GGC GAC AAC GCG ACC GTC GCC GCG GGC CAC GCC ACC CTG 541
 CGC GAG CAC CTG CGG GAC ATC AAG GCG AAG AAC ACC GAT GCA AAC 586
 TTT TAC GTG TGC CCA CCC CCC ACG GGC GCC ACG GTG GTG CAG TTC 631
 GAG CAG CCG CGC CGC TGC CCG ACC CGG CCC GAG GGT CAG AAC TAC 676
 ACG GAG GGC ATC GCG GTG GTC TTC AAG GAG AAC ATC GCC CCG TAC 721
 AAG TTC AAG GCC ACC ATG TAC TAC AAA GAC GTC ACC GTT TCG CAG 766
 GTG TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG TTT ATG GGG ATC TTT GAG 811
 GAC CGC GCC CCC GTC CCC TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG ATC AAC 856
 GCC AAG GGG GTC TGT CGG TCC ACG GCC AAG TAC GTG CGC AAC AAC 901
 CTG GAG ACC ACC GCG TTT CAC CGG GAC GAC CAC GAG ACC GAC ATG 946
 GAG CTG AAA CCG GCC AAC GCC GCG ACC CGC ACG AGC CGG GGC TGG 991
 CAC ACC ACC GAC CTC AAG TAC AAC CCC TCG CGG GTG GAG GCG TTC 1036
 CAC CGG TAC GGG ACG ACG GTA AAC TGC ATC GTC GAG GAG GTG GAC 1081
 GCG CGC TCG GTG TAC CCG TAC AAC GAG TTT GTG CTG GCG ACT GGC 1126
 GAC TTT GTG TAC ATG TCC CCG TTT TAC GGC TAC CGG GAG GGG TCG 1171
 CAC ACC GAA CAC ACC AGC TAC GCC GCC GAC CGC TTC AAG CAG GTC 1216
 GAC GGC TTC TAC GCG CGC GAC CTC ACC ACC AAG GCC CGG GCC ACG 1261

第4図-2

GCG CCG ACC ACC CGG AAC CTG CTC ACG ACC CCC AAG TTC ACC GTG 1306
 GCC TGG GAC TGG GTG CCA AAG CGC CCG TCG GTC TGC ACC ATG ACC 1351
 AAG TGG CAG GAG GTG GAC GAG ATG CTG CGC TCC GAG TAC GGC GGC 1396
 TCC TTC CGA TTC TCC TCC GAC GCC ATA TCC ACC ACC TTC ACC ACC 1441
 AAC CTG ACC GAG TAC CCG CTC TCG CGC GTG GAC CTG GGG GAC TGC 1486
 ATC GGC AAG GAC GCC CGC GAC GCC ATG GAC CGC ATC TTC GCC CGC 1531
 AGG TAC AAC GCG ACG CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCG CAG TAC TAC 1576
 CTG GCC AAT GGG GGC TTT CTG ATC GCG TAC CAG CCC CTT CTC AGC 1621
 AAC ACG CTC GCG GAG CTG TAC GTG CGG GAA CAC CTC CGA GAG CAG 1666
 AGC CGC AAG CCC CCA AAC CCC ACG CCC CCG CCG CCC GGG GCC AGC 1711
 GCC AAC GCG TCC GTG GAG CGC ATC AAG ACC ACC TCC TCC ATC GAG 1756
 TTC GCC CGG CTG CAG TTT ACG TAC AAC CAC ATA CAG CGC CAT GTC 1801
 AAC GAT ATG TTG GGC CGC GTT GCC ATC GCG TGG TGC GAG CTG CAG 1846
 AAT CAC GAG CTG ACC CTG TGG AAC GAG GCC CGC AAG CTG AAC CCC 1891
 AAC GCC ATC GCC TCG GTC ACC GTG GGC CGG CGG GTG AGC GCG CGG 1936
 ATG CTC GGC GAC GTG ATG GCC GTC TCC ACG TGC GTG CCG GTC GCC 1981
 GCG GAC AAC GTG ATC GTC CAA AAC TCG ATG CGC ATC AGC TCG CGG 2026
 CCC GGG GCC TGC TAC AGC CGC CCC CTG GTC AGC TTT CGG TAC GAA 2071
 GAC CAG GGC CCG TTG GTC GAG GGG CAG CTG GGG GAG AAC AAC GAG 2116
 CTG CGG CTG ACG CGC GAT GCG ATC GAG CCG TGC ACC GTG GGA CAC 2161
 CGG CGC TAC TTC ACC TTC GGT GGG GGC TAC GTG TAC TTC GAG GAG 2206
 TAC GCG TAC TCC CAC CAG CTG AGC CGC GCC GAC ATC ACC ACC GTC 2251
 AGC ACC TTC ATC GAC CTC AAC ATC ACC ATG CTG GAG GAT CAC GAG 2296
 TTT GTC CCC CTG GAG GTG TAC ACC CGC CAC GAG ATC AAG GAC AGC 2341
 GGC CTG CTG GAC TAC ACG GAG GTC CAG CGC CGC AAC CAG CTG CAC 2386
 GAC CTG CGC TTC GCC GAC ATC GAC ACG GTC ATC CAC GCC GAC GCC 2431
 AAC GCC GCC ATG TTC GCG GGC CTG GGC GCG TTC TTC GAG GGG ATG 2476
 GGC GAC CTG GGG CGT GCG GTC GGC AAG GTG GTG ATG GGC ATC GTG 2521

第4図-3

GGC GGC GTG GTA TCG GCC GTG TCG GGC GTG TCC TCC TTC ATG TCC 2566
AAC CCC TTT GGG GCG CTG GCC GTG GGT CTG TTG GTC CTG GCC GGC 2611
CTG GCG GCG GCC TTC TTC GCC TTT CGC TAC GTC ATG CGG CTG CAG 2656
AGC AAC CCC ATG AAG GCC CTG TAC CCG CTA ACC ACC AAG GAG CTC 2701
AAG AAC CCC ACC AAC CCG GAC GCG TCC GGG GAG GGC GAG GAG GGC 2746
GGC GAC TTT GAC GAG GCC AAG CTA GCC GAG GCC CGG GAG ATG ATA 2791
CGG TAC ATG GCC CTG GTG TCG GCC ATG GAG CAC ACG GAA CAC AAG 2836
GCC AAG AAG AAG GGC ACG AGC GCG CTG CTT AGC GCC AAG GTC ACC 2881
GAC ATG GTC ATG CGC AAG CGC CGC AAC ACC AAC TAC ACC CAA GTT 2926

CCC AAC AAA GAC AGT GAC GCC GAC GAG GAC GAC CTG TGA CGGGGG 2971
GTTTGTGTGTAATAAAAAACCGGGTGTAAACCGCATGCGCATCTTTTGGT 3023
TTTTTTTTTTGTACGCCCTTTGTGTGTGTGGGAAGAAAGAAAAAGGAACACA 3075
TAAACTCCCCCGGGTGTCCGCGGCCTGTTTCCTCTTTCCTTTCCCGTGACAA 3127
AACTGACCCCCCTTGGTCAGTGCCGATTCCCCCCCCCCCCCCCCACGCCTTCCT 3179
CCACGTGGAAGGCTTTTGTATTGTAAAGCTACCCGCCTACCCGCGCCTCCCA 3231
ATAAAAAAAAAAAGAACATACACCAATGGGTCTTATTTGGTATTACCTGGTT 3283
TATTTAAAAAGATATACAGTAAGACATCCCATGGTACCAAAGACCGGGGCGA 3335
ATCAGCGGGCCCCCATCATCTGAGAGACGAACAAATCGGCGGCGCGGGCCGT 3387
GTCAACGTCCACGTGTGCTGCGCTGCTGGCGTTGACAAGGGCCCCGGCCTCC 3439
GCGTTGGATGCCTCCGGTTGGGATCC 3465

第5圖-1

1-GTCAAGGGGGCCCTCTTTGATCACTCCACCACAGCTTCGCCAGGCCCCCAACACGGGCTGTATTACAGGTGGAGAACGTGGGGCTCCTCCGCGACCC
 101-TGAAGGAGGAGCTCGCCCGGTTTCATCATGGGGGGGGGGCTCGGTGCTGATTGGGGCGGTACGGGAATTCAGAGGTTTACTGTTTGGACGGCAATTC
 201-CGGAAATTAACGCCCACTCAGCGCGCGGCTGGGGATATATTCGGAGCTGATTATTCGCCACACACTCTTTGCCCTGGGTCTACCGGTGCGGGGAGCTCGAG
 301-TTCCGCCCGCGGACTGCAGCGCGCCGACCTCCGAGGTCGTACCGTTACCGCGCGGCTATATCTCAGGTACGACTCCGACTGTCCGCTGGTGGCCA
 401-TCGTCGAGAGCGCCCGGAGCGGCTGTATCGGCCCGGTCGGTGGTGTACGAGCGGACGTTTTCTCGATCCTCTACTCGGTCTCTCCAGCACCTCGC
 501-CCCCAGGCTACCTGACGGGGGACGACGGGCGCCCGGTAGTCCGGCC ATG CAC CAG GGC GCC CCC TCG TGG GGG CGC CGG TGG TTC
 Met His Gln Gly Ala Pro Ser Trp Gly Arg Arg Trp Phe-13
 587-GTC GTA TGG GCG CTC TTG GGG TTG ACG CTG GGG GTC CTG GTG GCG TCG GCG GCT CCG AGT TCC CCC GGC ACG CCT
 Val Val Trp Ala Leu Leu Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Val Ala Ser Ala Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Pro-38
 662-GGG GTC GCG CGC GAC CCA GGC GGC GAA CCG GGG CCC TGC CAC TCC GGC GCC GGC CTT GGC GCC GCC CCA ACG
 Gly Val Ala Arg Asp.Pro Gly Gly Glu Arg Gly Pro Cys His Ser Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ala Pro Thr-63
 737-GGG GAC CCG AAA CCG AAG AAG AAC AAA CCG AAA AAC CCA ACG CCA CCA CCG CCC GCC GGC GAC AAC GCG ACC
 Gly Asp Pro Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Lys Asn Pro Thr Pro Pro Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr-88
 812-GTC GCC GCG GGC CAC GCC ACC CTG CGC GAG CAC CTG CGG GAC ATC AAG GCG GAG AAC ACC GAT GCA AAC TTT TAC
 Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn Phe Tyr-113
 887-GTG TGC CCA CCC ACG GGC GCC ACG GTG GTG CAG TTC GAG CAG CCG CGC CGC TGC CGC ACC CGG CCC GAG GGT
 Val Cys Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly-138
 962-CAG AAC TAC ACG GAG GGC ATC GCG GTG GTC TTC AAG GAG AAC ATC GCC CCG TAC AAG TTC AAG GCC ACC ATG TAC
 Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Phe Lys Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr-163
 1037-TAC AAA GAC GTC ACC GTT TCG CAG GTG TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG TTT ATG GGG ATC TTT GAG GAC CGC
 Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg-188
 1112-GCC CCC GTC CCC TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG ATC AAC GCC AAG GGG GTC TGT CGG TCC ACG GCC AAG TAC GTG
 Ala Pro Val Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala Lys Tyr Val-213
 1187-CGC AAC AAC CTG GAG ACC ACC GCG TTT CAC CGG GAC CAC GAG ACC GAC ATG GAG CTG AAA CCG GCC AAC GCG
 Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala-238

第5図-2

1262-GCG ACC GGC ACC GCG GGC TGG CAC ACC ACC GAC CTC AAG TAC AAC CCC TCG CGG GTG GAG GCG TTC CAC CCG
 Ala Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg-263
 1337-TAC GGG ACG ACG GTA AAC TGC ATC GTC GAG GAG GTG GAC GCG TCG GTG TAC CCG TAC GAC GAG TTT GTG CTG
 Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu-288
 1412-GCG ACT GGC GAC TTT GTG TAC ATG TCC CGG TTT TAC GGC TAC CCG GAG GGG TCG CAC ACC GAA CAC ACC ACG TAC
 Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Thr Tyr-313
 1487-GCC GGC GAC CCG TTC AAG CAG GTC GAC GGC TTC TAC GCG CCG GAC CTC ACC ACC AAG GCC CCG GCC ACG GCG CCG
 Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr Ala Pro-338
 1562-ACC ACC CCG AAC CTG CTC ACG ACC CCC AAG TTC ACC GTG GCG TGG GAG TGG GTG CCA AAG CCG CCG TCG GTG TGC
 Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys-353
 1637-ACC ATG ACC AAG TGG CAG GAA GTG GAC GAG ATG CTG CCG TCC GAG TAC GGC GGC TCC TTC CGA TTC TCC TCC GAC
 Thr Met Thr Lys Trp Lys Trp Gln Glu Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp-388
 1712-GCC ATA TCC ACC ACC TTC ACC ACC AAC CTG ACC GAG TAC CCG CTC TCG CCG GTG GAC CTG GGG GAC TGC ATC GGC
 Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly-413
 1787-AAG GAC GCC CCG GAC GCC ATG GAC CCG ATC TTC GCC CCG AGG TAC AAC GCG ACG CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCG
 Lys Asp Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly Gln Pro-438
 1862-CAG TAC TAC CTG GCC AAT GGG GGC TTT CTG ATC GCG TAC CAG CCC CTT CTC AGC AAC ACG CTC GCG GAG CTG TAC
 Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr-463
 1937-GTG CCG GAA CAC CTC CGA GAG CAG AGC CCG AAG CCC CCA AAC CCC CCG CCC CCG CCC GCG GCC AGC GCC AAC
 Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Arg Lys Pro Asn Pro Thr Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn-488
 2012-GCG TCC GTG GAG CCG ATC AAG ACC ACC TCC TCC ATC GAG TTC GCC CCG CTG CAG TTT ACG TAC AAC CAC ATA CAG
 Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile Gln-513
 2087-CGC CAT GTC AAC GAT ATG TTG GGC CCG GTT GCC ATC GCG TGG TGC GAG CTA CAG AAT CAC GAG CTG ACC CTG TGG
 Arg His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp-538
 2162-AAC GAG GCC AAG CTG AAG CCC AAG GCC ATC GCC TCG GTC ACC GTG GGC CCG GTG ACG GCG CCG ATG CTC
 Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Val Thr Val Gly Arg Val Ser Ala Arg Met Leu-563

第5圖-3

2237-GGC GAC GTG ATG GCC GTG TCC ACG TGC GTG CCG GTC GCC GCG GAC AAC GTG ATC GTC CAA AAC TCG ATG CGC ATC
 Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile-588
 2312-AGC TCG CGG CCC GGG GCC TGC TAC AGC CGC CCC CTG GTC AGC TTT CGG TAC GAA GAC CAG GGC CCG TTG GTC GAG
 Ser Ser Arg Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp Gln Gly Plo Leu Val Glu-613
 2387-GGG CAG CTG GGG GAG AAC AAC GAG CTG CCG CTG ACG CGC GAT GCG ATC GAG CCG TGC ACC GTG GGA CAC CGC CGC
 Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg-638
 2462-TAC TTC ACC TTC GGT GGG GGC TAC GTG TAC TTC GAG GAG TAC GCG TAC TCC CAC CAG CTG AGC CGC GCC GAC ATC
 Tyr Phe Thr Phe Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser His Gln Leu Ser Arg Ala Asp Ile-653
 2537-ACC ACC GTC AGC ACC TTC ATC GAC CTC AAC ATC ACC ATG CTG GAG GAT CAC GAG TTT GTC CCC CTG GAG GTG TAC
 Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr-688
 2612-ACC CGC CAC GAG ATC AAG GAC AGC GGC CTG GAC TAC ACG GAG GTC CAG CGC AAC CAG CTG CAC GAC CTG
 Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu-713
 2687-CGC TTC GCC GAC ATC GAC ACG GTC ATC CAC GCC GAC GCC AAC GCC ATG TTC GCG GGC CTG GGC GCG TTC TTC
 Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile His Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Gly Ala Phe Phe-738
 2762-GAG GGC ATG GGC GAC CTG GGG CGC GCG GTC GGC AAG GTG GTG ATG GGA CTC GTG GGC GGC GTG GTA TCG GCG GTG
 Glu Gly Met Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val Val Met Gly Leu Val Val Ser Ala Val-763
 2837-TCG GGC GTG TCC TCC ATG TCC AAC CCC TTT GGG GCG CTG GCC GTG GGT CTG TTG GTC CTG GCC GGC CTG GCG
 Ser Gly Val Ser Ser Phe Met Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val Val Ser Ala Ala-788
 2912-GCG GCC TTC TTC GCC TTT CGT TAC GTC ATG CCG CTG CAG AGC AAC CCC ATG AAG GCC CTG TAC CCT CTA ACC ACC
 Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Met Arg Leu Gln Ser Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr-813
 2987-AAG GAG CTC AAG AAC CCC ACC AAC CCG GAC GCG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GGC GAC TTT GAC GAG GCC AAG
 Lys Glu Leu Lys Asn Pro Thr Asn Pro Asp Ala Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Phe Asp Glu Ala Lys-838
 3062-CTA GCC GAG GCC AGG GAG ATG ATA CGG TAC ATG GCC CTG GTG TCG GCC ATG GAG CGC ACG GAA CAC AAG GCC AAG
 Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Lys-863
 3137-AAG AAG GGC ACG AGC CGG CTG CTC AGC GCC AAG GTC ACC GAC ATG GTC ATG CGC AAG CGC CGC AAC ACC AAC TAC
 Lys Lys Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ser Ala Lys Val Thr Asp Met Val Met Arg Lys Arg Arg Asn Thr Asn Tyr-888

第5図-4

3212-ACC CAA GTT CCC AAC AAA GAC GGT GAC GCC GAC GAG GAC GAC CTG TGACGGGGGTTTGTGTAATAAAACCACGGGTGTAA
 Thr Gln Val Pro Asn Lys Asp Gly Ala Asp Glu Asp Leu END
 3297-ACCGCATGCGCATCTTTTGGTTTTTTTGGTTCAGCTTTTGTGTCGTTGGTGGAGAAAGAAAGGAACACATAAATCCCGCGGTGTCCGCGGC
 3397-CTGTTTCCTCTTTCCCTTCCCGTGACAAACGGACCCCTTGGTCAGTCCGATTTCCTCCCGCCACGCCCTTCTCCACGTCAAGGCTTTTGCATTGT
 3497-AAAGCTACCGGCTACCGGCGCTCCCAATAAAAAAAGAACATACCAATGGTCTTTATTTGGTATTACCTGGTTTATTTAAAAAGATATACAGTA
 3597-AGACATCCCATGTACCAAGACCGGGGCGAATCAGCGGGGCCCCCATCTGTGAGAGACGACAAATCGCGGCGCGGCGCGTGTCAACGTCCACGTGTG
 3697-CTGCGCTGCTGGCGTTGACAAAGGCCCCCGGCTCCGCGTTGGATGCTCCGGTTGGGATCC

第 6 図 - /

CTCGGAGAAGATGCTGCGGTACGGTCCACGGCGAGGTGCTGCCCGCGACGTTGCGCGCG 60
 GTCGCCAACGGCTTTGCGGCCGCGCGCGCGCTTCTCGCCGCCCTGACGGCGGGCGCGGG 120
 CACGGTCAATCGACAACCGCTCGGCGCGGGCGGTGTTGACGCGCACCGGTTTATGCGAGC 180
 GTCTCTCCTGCGACACCAGGTGGACCGGCGCTGCTCCCCAGCATCACCATCGCTTCTT 240
 CGAGCTCGTCAACGGGCGCCCTCTTTGATCACTCCACCCACAGCTTCGCCCAGCCCCCAA 300
 CACCGCGCTGTATTACAGCGTCGAGAACGTGGGGCTCCTGCCGCACCTGAAGGAGGAGCT 360
 CGCCCGGTTTATCATATGGGGCGGGGGGCTCGGGTGTGATTGGGCCGTACGGAATTTCA 420
 GAGGTTTTACTGTTTTGACGGCAATTTCCGGAATAACGCCCACTCAGCGCGCGCGCTGGCG 480
ATAATTCGCGAGCTGATTATCGCCACACACTCTTTGCCTCGGTCTACCGGTGCGGGGA 540
 GCTCGAGTTGCGCGCGCGGACTGCGAGCGCGCGACCTCCGAAGGTGCTTACCGTTACCC 600
 GCGCGCGGTATATCTCACGTACGACTCCGACTGTCCGCTGGTGGCCATCGTCGAGAGCGC 660
 CCGCGACGGCTGTATCGGCCCCGGTGGTGTGGTCTACGACCGAGACGTTTTCTCGAT 720
 CCTCTACTCGGTCTCCAGCACCTCGCCCCAGGCTACCTGACGGGGGCGACGACGGGC 779
 MetArgGlnGlyAlaAlaArgGlyCysArgTrpPheValValTrp -15
 CCGCGTAGTCCCGCCATGCGCCAGGGCGCGCGGGGTGCGGTGGTTCGTCTGTATGG 839
 AlaLeuLeuGlyLeuThrLeuGlyValLeuValAlaSerAlaAlaProSerSerProGly 6
 GCGCTCTTGGGGTGGACGCTGGGGGTCTGTTGGCGTGGCGGGCTCCGAGTTCCCCCGGC 899
 ThrProGlyValAlaAlaAlaThrGlnAlaAlaAsnGlyGlyProAlaThrProAlaPro 26
 ACGCTGGGGTGGCGCGCGCGACCCAGGCGCGAACGGGGGACCTGCCACTCCGGCGCGG 959
 ProAlaProGlyProAlaProThrGlyAspThrLysProLysLysAsnLysLysProLys 46
 CCGCCCCCTGGCCCCCTCCCCAACGGGGGACACGAAACCGAAGAACAACAAAAACCGAAA 1019
 AsnProProProProArgProAlaGlyAspAsnAlaThrValAlaAlaGlyHisAlaThr 66
 AACCCACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGACAAACGCGACCGTCCCGCGGGCCACGCCACC 1079
 LeuArgGulHisLeuArgAspIleLysAlaGluAsnThrAspAlaAsnPheTyrValCys 86
 CTGCGCGAGCACCTGCGGGACATCAAGGCGGACAAACCGATGCAAACTTTTACGTGTGC 1139
 ProProProThrGlyAlaThrValValGlnPheGluGlnProArgArgCysProThrArg 106
 CCACCCCCACGGGCGCCACGGTGGTGCAGTTCGACGAGCGCGCGCGCTGCCCGACCCGG 1199
 ProGluGlyGlnAsnTyrThrGluGlyIleAlaValValPheLysGluAsnIleAlaPro 126
 CCGGAGGGTCAAGACTACACGGAGGGCATCGCGGTGGTCTTCAAGGACAACATCGCCCCG 1259
 TyrLysPheLysAlaThrMetTyrTyrLysAspValThrValSerGlnValTrpPheGly 146
 TACAAGTTCAAGGCCACCATGTACTACAAAGACGTCACCGTTTCGCAGGTGTGGTTCGGC 1319
 HisArgTyrSerGlnPheMetGlyIlePheGluAspArgAlaProValProPheGluGlu 166
 CACCGCTACTCCAGTTTATGGGGATCTTTGAGGACCGCGCCCCCGTCCCCITCGAGGAG 1379
 ValIleAspLysIleAsnAlaLysGlyValCysArgSerThrAlaLysTyrValArgAsn 186
 GTGCTCGACAAGATCAACGCCAAGGGGGTCTGTCCGTCCACGGCCAAGTACGTGCGCAAC 1439

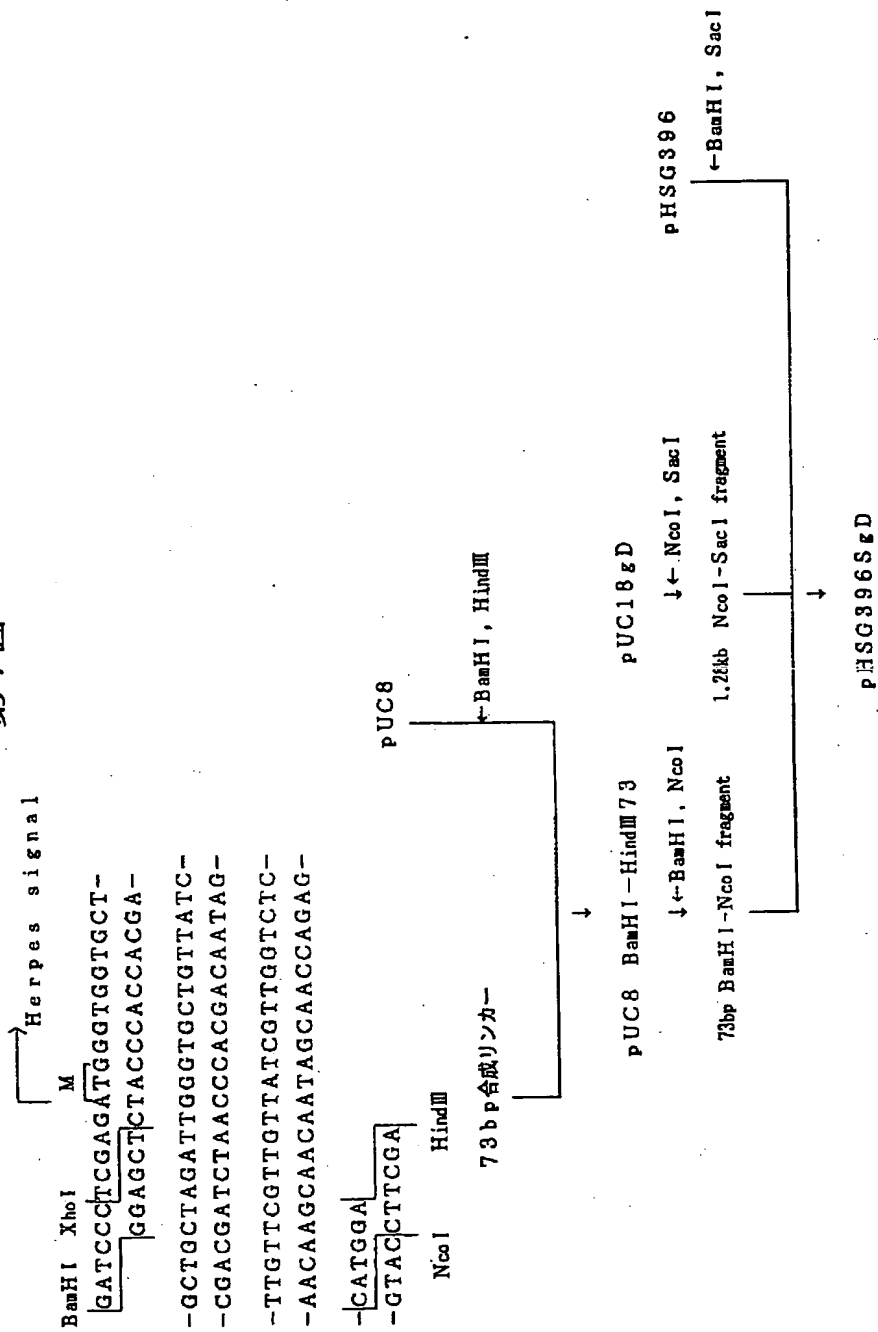
第 6 圖 - 2

AsnLeuGluThrThrAlaPheHisArgAspAspHisGluThrAspMetGluLeuLysPro	206
AACCTGGAGACCACCGCGTTTCACCGGGACGACCACGAGACCGACATGGAGCTGAAACCG	1499
AlaAsnAlaAlaThrArgThrSerArgGlyTrpHisThrThrAspLeuLysTyrAsnPro	226
GCCAACGCGCGACCCGACGAGCCGGGGCTGGCACACCACCGACCTCAAGTACAACCCC	1559
SerArgValGluAlaPheHisArgTyrGlyThrThrValAsnCysIleValGluGluVal	246
TCGCGGGTGGAGGCGTTCCACCGGTACGGGACGACGGTAAACTGCATCGTGGAGGAGTG	1619
AspAlaArgSerValTyrProTyrAspGluPheValLeuAlaThrGlyAspPheValTyr	266
GACGCGCGCTCGGTGTACCCGTACGACGAGTTTGTGCTGGCGACTGGCGACTTTGTGTAC	1679
MetSerProOheTyrGlyTyrArgGluAlaSerHisThrGluHisThrSerTyrAlaAla	286
ATGTCCCGCTTTTACGGCTACCGGGAGGGGTGCGAGACCGAACACACCAGCTACGCCGCC	1739
AspArgPheLysGlnValAspGlyPheTyrAlaArgAspLeuThrTyrLysAlaArgAla	306
GACCGCTTCAAGCAGGTTGACGGCTTCTACGCGCGCGACCTCACCACCAAGGCCCGGCC	1799
ThrAlaProThrThrArgAsnLeuLeuThrThrProLysPheThrValAlaTrpAspTrp	326
ACGGCGCGGACCCACCGGAACCTGCTCAGCAGCCCCAAGTTACCGTGGCCIGGGACTGG	1859
ValProLysArgProSerValCysThrMetThrLysTrpGlnGluValAspGluMetLeu	346
GTGCCAAAGCGCCCGTGGTCTGCACCATGACCAAGTGGCAGGAGGTGGACGAGATGCTG	1919
ArgSerGluTyrGlyGlySerPheArgPheSerSerAspAlaIleSerThrThrPheThr	366
CGCTCCGAGTACGGCGGGCTCCITCCGATTCTCCTCCGACGCCATATCCACCACCTTACCC	1979
ThrAsnLeuThrGluTyrProLeuSerArgValAspLeuGlyAspCysIleGlyLysAsp	386
ACCAACCTGACCGAGTACCGCTCTCGCGCTGGAGCTGGGGGACTGCATCGGCAAGGAC	2039
AlaArgAspAlaMetAspArgIlePheAlaArgArgTyrAsnAlaThrHisIleLysVal	406
AGCCGCGGACGCCATGGACCGCATCTTCGCCCGCAGGTACAACGCGACGCACATCAAGGTG	2099
GlyGlnProGlnTyrTyrLeuAlaAsnGlyGlyPheLeuIleAlaTyrGlnProLeuLeu	426
GGCGAGCCGCACTACTACCTGGCCAATGGGGGCTTCTGTATCGCGTACCAGCCCTTCTC	2159
SerAsnThrLeuAlaGluLeuTyrValArgGluHisLeuArgGluGlnSerArgLysPro	446
AGCAACACGCTCGCGGAGCTGTACGTGCGGGAACACCTCCGAGAGCAGAGCCGCAAGCCC	2219
ProAsnProThrProProProProGlyAlaSerAlaAsnAlaSerValGluArgIleLys	466
GCAAACCCACGCCCCCGCGCGGGGCGAGCGCCAACGCGTCCGTGGAGCGCATCAAG	2279
ThrThrSerSerIleGluPheAlaArgLeuGlnPheThrTyrAsnHisIleGlnArgHis	486
ACCACCTCCTCCATCGAGTTTCGCCCGGCTGCAGTTTACGTACAACCACATACAGGCCAT	2339
ValAsnAspMetLeuGlyArgValAlaIleAlaTrpCysGluLeuGlnAsnHisGluLeu	506
GTCAACGATATGTTGGGCCGCGTTGCCATCGCGTGGTGGAGCTGCAGAATCAGGAGCTG	2399
ThrLeuTrpAsnGluAlaArgLysLeuAsnProAsnAlaIleAlaSerAlaThrValGly	526
ACCTGTGGAACGAGGCCCGCAAGCTGAACCCCAACGCCATCGCCTCGGCCACCGTGGGC	2459
ArgArgValSerAlaArgMetLeuGlyAspValMetAlaValSerThrCysValProVal	546
CGGCGGGTGAGCGCGCGGATGCTCGGCGACGTGATGGCCGTCTCCACGTGCGTGCCGCTC	2519
AlaAlaAspAsnValIleValGlnAsnSerMetArgIleSerSerArgProGlyAlaCys	566
GCCGCGGACAACGTGATCGTCCAAAACCTCGATGCGCATCAGCTCGCGGCCCGGGGCTGC	2579
TyrSerArgProLeuValSerPheArgTyrGluAspGlnGlyProLeuValGluGlyGln	586
TACAGCCGCCCTGGTCAGCTTTCGGTACGAAGACCAGGGCCCGTTGGTCGAGCGGCAG	2639

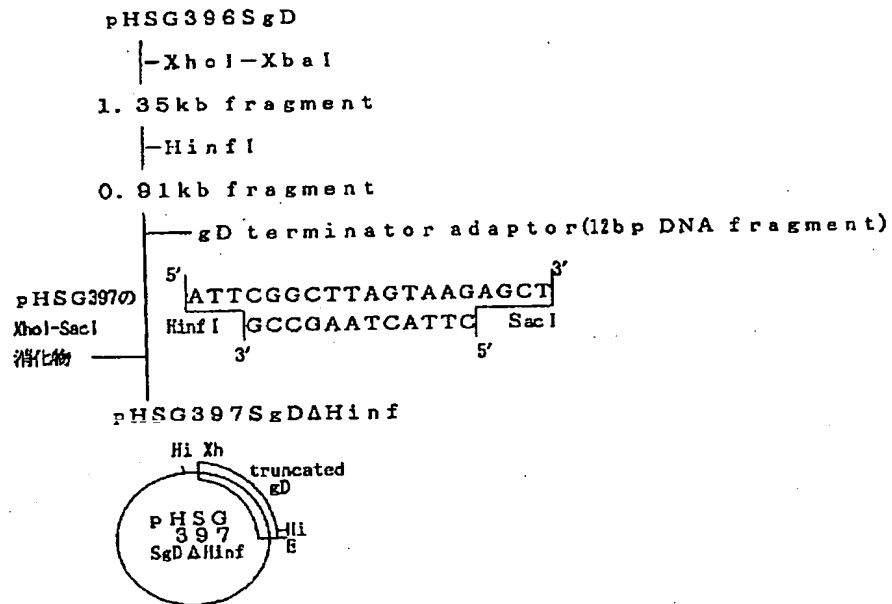
第 6 図 - 3

LeuGlyGluAsnAsnGluLeuArgLeuThrArgAspAlaIleGluProCysThrValGly 606
 CTGGGGGAGAACACGAGCTGCGGCTGACGCGCGATGCGATCGAGCCGTGCACCGTGGGA 2699
 HisArgArgTyrPheThrPheGlyGlyGlyTyrValTyrPheGluGluTyrAlaTyrSer 626
 CACCGGCGCTACTTCACCTTCGGCGGGGGCTACGTGTACTTCGAGGAGTACGCGTACTCC 2759
 HisGlnLeuSerArgAlaAspIleThrThrValSerThrPheIleAspLeuAsnIleThr 646
 CACCAGCTGAGCCGCGCCGACATCACCACCGTCAGCACCTTCATCGACCTCAACATCACC 2819
 MetLeuGluAspHisGluPheValProLeuGluValTyrThrArgHisGluIleLysAsp 666
 ATGCTGGAGGATCAGAGTTTGTCCCCCTGGAGGTGTACACCGCCACGCGATCAAGGAC 2879
 SerGlyLeuLeuAspTyrThrGluValGlnArgArgAsnGluLeuHisAspLeuArgPhe 686
 AGCGGCTGCTGGACTACACGGAGGTCCAGCGCGCAACAGCTGCACGACCTGCGCTTC 2939
 AlaAspIleAspThrValIleHisAlaAspAlaAsnAlaAlaMetPheAlaGlyLeuGly 706
 GCGGACATCGACACGGTCATCCACGCGGACGCCAACGCGCGCATGTTCGCGGGCTGGGC 2999
 AlaPhePheGluGlyMetGlyAspLeuGlyArgAlaValGlyLysValValMetGlyIle 726
 GCGTTCCTTCGAGGGGATGGGCGACCTGGGGCGCGCGGTTCGCCAAGGTGGTGTGGGCATC 3059
 ValGlyGlyValValSerAlaValSerGlyValSerSerPheMetSerAsnProPheGly 746
 GTGGCGGCGTGGTATCGGCCGTGTGGGGCGTGTCTCTTCATGTCCAACCGCTTGGG 3119
 AlaLeuAlaValGlyLeuLeuValLeuAlaGlyLeuAlaAlaAlaPhePheAlaPheArg 766
 GCGCTGGCCGTGGGTCTGTTGGTCTGGCCGGCCTGGCGGCGGCTTCTTCGCCCTTTCGC 3179
 TyrValMetArgLeuGlnSerAsnProMetLysAlaLeuTyrProLeuThrThrLysGlu 786
 TACGTATGCGGCTGCAGAGCAACCCCATGAAGGCCCTGTACCGGCTAACCAACAGGAG 3239
 LeuLysAsnProThrAsnProAspAlaSerGlyGluGlyGluGlyGlyGlyAspPheAsp 806
 CTCAAGAACCCCAACCCGACGCGTCCGGGGAGGGCGAGGAGGGCGGCGACTTGGAC 3299
 GluAlaLysLeuAlaGluAlaArgGluMetIleArgTyrMetAlaLeuValSerAlaMet 826
 GAGGCCAAGCTAGCCGAGGCCCGGGAGATGATACGGTACATGGCCCTGGTGTCTGCCATG 3359
 GluArgThrGluHisLysAlaLysLysLysGlyThrSerAlaLeuLeuSerAlaLysVal 846
 GAGCGCACGGAACACAAGGCCAAGAAGAAGGGCACGAGCGCGCTGCTCAGCGCCAAGGTC 3419
 ThrAspMetValMetArgLysArgArgAsnThrAsnTyrThrGlnValProAsnLysAsp 866
 ACCGACATGGTCTATGCGCAAGCGCCGCAACACCAACTACACCAAGTTCCCAACAAAGAC 3479
 GlyAspAlaAspGluAspAspLeu 874
 GGTGACGCCGACGAGGACGACCTGTGACGGGGGGTTTGTGTGIAAATAAAAAACACGGGTG
 ITAAACCGCATGTGCATCTTTTGGTTTGTITTTGGTACGCCCTTTTGTGTGTGTGGAA 3599
 GAAAGAAAAGGGAACACATAAACTCCCCGGGTGTCCGCGGCTGTTTCTCTTTCTTT
 CCGGTGACAAAACGACCCCTTGGTCAGTGCCGATTCCCCCCCCACGCCCTTCTCCACG 3719
 TCGAAGGCTTTTGCATTGTAAAGCTACCCGCCCTACCCGCGCCTCCCAATAAAAAAGAAC
 ATACACCAATGGGTCTTATTTGGTATTACCTGGTTTATTTAAAAAGATATACAGTAAGAC 3839
 ATCCCATGGTACCAAAGACCGGGGCGAATCAGCGGGCCCCATCATCTGAGAGACGAACA
 AATCGGCGGCGGGGCGCGTGTCAACGTCCACGTGTGCTGCGCTGCTGGCGTTGACAAGGG 3959
 CCCCCGCTCGCGTTGGATGCCTCCGGTTGGGATCC 3996

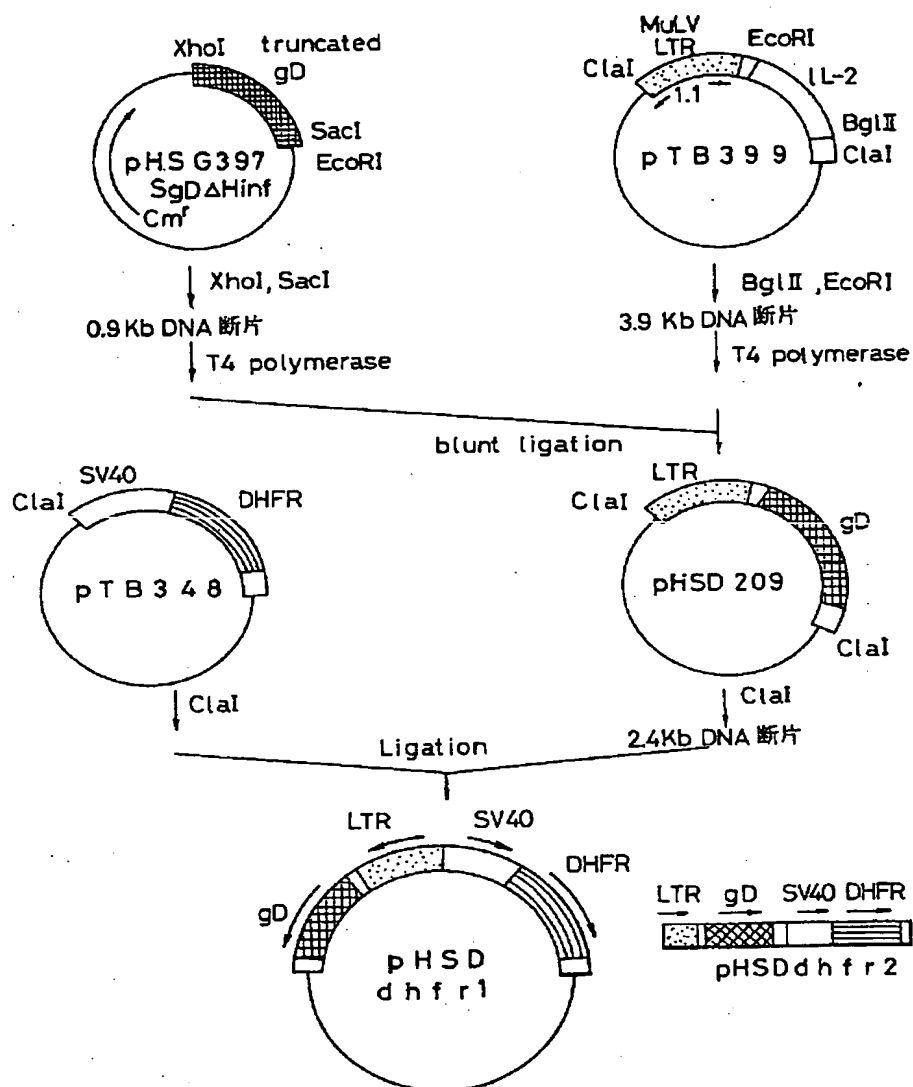
第7図



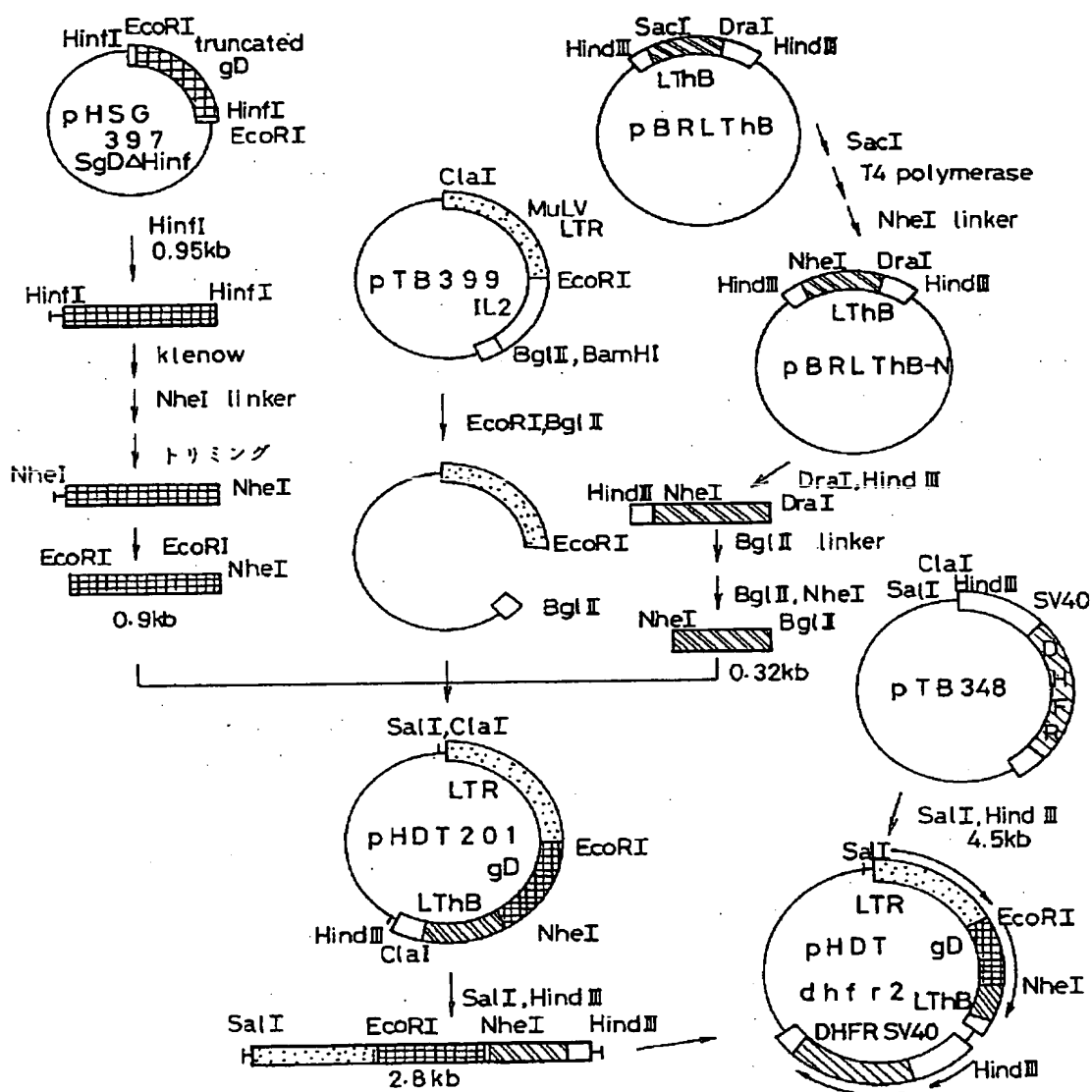
第 8 図



第9図



第10図



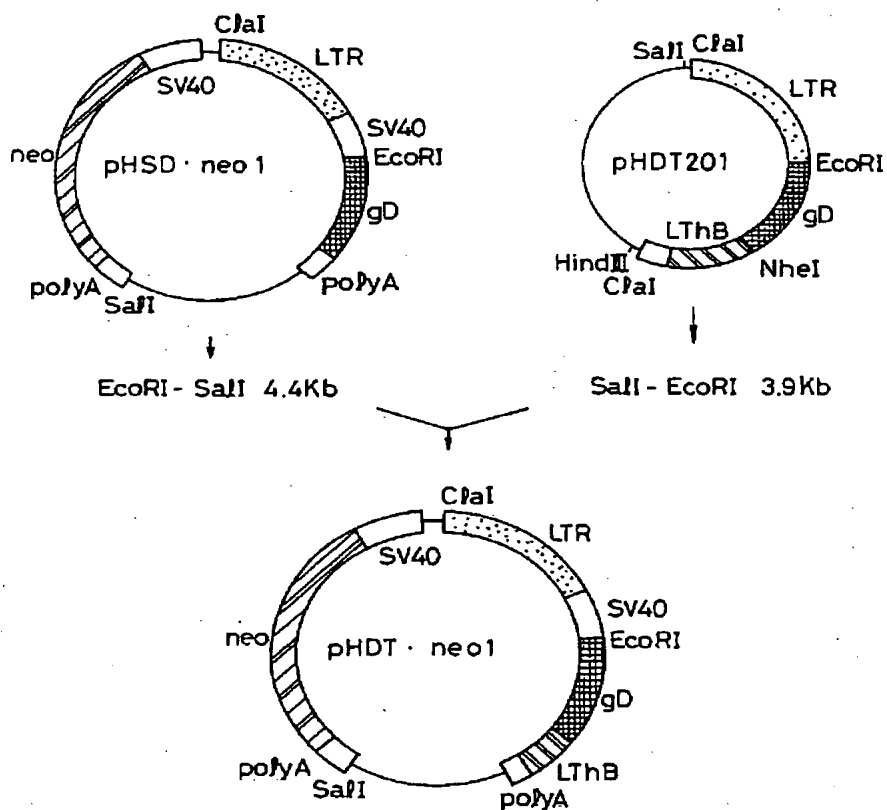
第 1 1 図

1 ATG GGG GGG GCT GCC GCC AGG TTG GGG GCC GTG ATT TTG TTT GTC
 46 GTC ATA GTG GGC CTC CAT GGG GTC CGC GGC AAA TAT GCC TTG GCG
 91 GAT GCC TCT CTC AAG ATG GCC GAC CCC AAT CGC TTT CGC GGC AAA
 136 GAC CTT CCG GTC CTG GAC CCG CTG ACC GAC CCT CCG GGG GTC CCG
 181 CGC GTG TAC CAC ATC CAG GCG GGC CTA CCG GAC CCG TTC CAG CCC
 226 CCC AGC CTC CCG ATC ACG GTT TAC TAC GCC GTG TTG GAG CGC GCC
 271 TGC CGC AGC GTG CTC CTA AAC GCA CCG TCG GAG GCC CCC CAG ATT
 316 GTC CGC GGG GCC TCC GAA GAC GTC CGG AAA CAA CCC TAC AAC CTG
 361 ACC ATC GCT TGG TTT CCG ATG GGA GGC AAC TGT GCT ATC CCC ATC
 406 ACG GTC ATG GAG TAC ACC GAA TGC TCC TAC AAC AAG TCT CTG GGG
 451 GCC TGT CCC ATC CGA ACG CAG CCC CGC TGG AAC TAC TAT GAC AGC
 496 TTC AGC GCC GTC AGC GAG GAT AAC CTG GGG TTC CTG ATG CAC GCC
 541 CCC GCG ITT GAG ACC GCC GGC ACG TAC CTG CCG CTC GTG AAG ATA
 586 AAC GAC TGG ACG GAG ATT ACA CAG TTT ATC CTG GAG CAC CGA GCC
 631 AAG GGC TCC TGT AAG TAC GCC CTC CCG CTG CGC ATC CCC CCG TCA
 676 GCC TGC CTC TCC CCC CAG GCC TAC CAG CAG GGG GTG ACG GTG GAC
 721 AGC ATC GGG ATG CTG CCC CGC TTC ATC CCC GAG AAC CAG CGC ACC
 766 GTC GCC GTA TAC AGC TTG AAG ATC GCC GGG TGG CAC GGG CCC AAG
 811 GCC CCA TAC ACG AGC ACC CTG CTG CCC CCT GAG CTG TCC GAG ACC
 856 CCC AAC GCC ACG CAG CCA GAA CTC GCC CCG GAA GAC CCC GAG GAT
 901 TCG CTA GCG CCC CAG TCT ATT ACA GAA CTA TGT TCG GAA TAT CGC
 946 AAC ACA CAA ATA TAT ACG ATA AAT GAC AAG ATA CTA TCA TAT ACG
 991 GAA TCG ATG GCA GGC AAA AGA GAA ATG GTT ATC ATT ACA TTT AAG
 1036 AGC GGC GCA ACA TTT CAG GTC GAA GTC CCG GGC AGT CAA CAT ATA
 1081 GAC TCC CAA AAA AAA GCC ATT GAA AGG ATG AAG GAC ACA TTA AGA
 1126 ATC ACA TAT CTG ACC GAG ACC AAA ATT GAT AAA TTA TGT GTA TGG
 1171 AAT AAT AAA ACC CCC AAT TCA ATT GCG GCA ATC AGT ATG GAA AAC
 1216 TAG

第 1 2 図

1 Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val
 16 Val Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala
 31 Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys
 46 Asp Leu Pro Val Leu Asp Pro Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg
 61 Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro
 76 Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala
 91 Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
 106 Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu
 121 Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile
 136 Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly
 151 Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser
 166 Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala
 181 Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile
 196 Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala
 211 Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser
 226 Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp
 241 Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr
 256 Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys
 271 Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr
 286 Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 301 Ser Leu Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg
 316 Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr
 331 Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys
 346 Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile
 361 Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg
 376 Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp
 391 Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn *

第13図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5

// A 61 K 39/00
39/245
(C 12 N 15/62
C 12 R 1:19
1:92)
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)

識別記号

G

片内整理番号

8829-4C
8829-4C

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.